Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 4, Winter 2022, p. 475-488

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، ص. ۴۸۸-۴۷۵

مقاله پژوهشی

تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید (*Phlomis cancellata Bunge*) بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی

الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی[1*]، محسن کاظمی[2]، سمیه حیدری[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۶

ابراهیمی خرم آبادی، ا.، م. کاظمی، و س. حیدری. ۱۴۰۰. تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید (*Phlomis cancellata Bunge*) بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۴): ۴۸۸-۴۷۵.

چکیده

این آزمایش با هدف بررسی اثر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی انجام شد. جهت تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید، یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه‌شده از اندام‌های هوایی گیاه به محلول نیترات نقره ۴/۷۶ میلی‌مولار در pH= ۶/۸۴ اضافه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سلسیوس مورد انکوباسیون قرار گرفت. اثرات افزایش نانو ذرات سنتز شده از گیاه گوش‌بره سفید (۰، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر خصوصیات تخمیری جیره گاوهای پرتولید با استفاده از روش تولید گاز در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر، نرخ تولید گاز و حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ساعات مختلف انکوباسیون نداشت. در این آزمایش بین تیمارهای مختلف از نظر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی، مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی، انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب فرار، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده آن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در تیمار یک (فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید) همبستگی منفی و معنی‌دار بین هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی با حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون و در تیمار دو (حاوی ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید) همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری با حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون ثبت گردید. مکمل کردن مقادیر افزایشی نانو ذرات نقره توانست فراسنجه‌های تولید گاز در خوراک پایه را تغییر دهد.

واژه‌های کلیدی: تولید گاز، خوراک، شکمبه، گوش‌بره، نانو ذرات نقره.

مقدمه

هضم میکروبی خوراک در شکمبه منجر به تولید اسیدهای چرب فرار، پروتئین میکروبی و گازها می‌گردد. اسیدهای چرب فرار و پروتئین میکروبی بخش عمده‌ای از احتیاجات انرژی و پروتئینی نشخوارکنندگان را تأمین می‌کنند. با این حال فرایند هضم الیاف در شکمبه به‌دلیل عواملی هم‌چون تأثیرگذاری لیگنین به‌عنوان یک سد فیزیکی در مقابل تجزیه میکروبی پلی‌سکاریدهای الیاف، کارآمد نیست (۷، ۳۳). گازهای حاصل از تخمیر شکمبه‌ای به‌عنوان مواد زائد به محیط دفع می‌شوند. بیشتر هیدروژن تولیدشده در شکمبه معمولاً برای تولید متان استفاده می‌شود تا فشار جزئی هیدروژن، در سطوح پایین، حفظ شود. تولید متان در شکمبه می‌تواند با کاهش تولید هیدروژن یا افزایش میزان مصرف هیدروژن، کاهش یابد. مهار مستقیم تولید هیدروژن باعث کاهش تخمیر شکمبه‌ای و ایجاد اختلال در هضم الیاف می‌شود (۲۰). بنابراین، افزایش مصرف هیدروژن از طریق افزایش واکنش‌های پذیرنده الکترون در شکمبه، راهبردی مناسب
جهت کاهش تولید متان بدون تأثیر بر هضم الیاف خواهد بود.

۱ و ۲- استادیار گروه علوم‌دامی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.
۳- استادیار گروه شیمی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Eliiass378@gmail.com)
Doi:10.22067/ijasr.2021.38202.0

درگذشته به‌منظور کنترل فرآیند هضم در شکمبه از روش‌های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و زیست‌فناوری گوناگونی استفاده شده است که در عمل چندان اثرگذار نبوده‌اند (۴۵). همچنین در سال‌های اخیر بررسی نقش عصاره‌های گیاهی و روغن‌های ضروری در کنترل فرآیند هضم در شکمبه نشان می‌دهد که برخی از عصاره‌های گیاهی، روغن‌های ضروری و متابولیت‌های ثانویه گیاهی در کاهش تولید متان و جمعیت پروتوزوآیی مؤثر هستند (۴۵).

فناوری نانو به‌عنوان یک راهکار نوین می‌تواند از طریق تولید نانو ذرات استفاده‌شده در خوراک‌های جدید یا افزودنی‌ها، شرایط هضم و جذب را در نشخوارکنندگان، بهبود بخشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد، افزودن نانو ذرات روی به جیره گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان تحت حاد، باعث کاهش میزان ابتلا و افزایش تولید در گله می‌شود (۴۲). محققان گزارش کردند افزودن نانو ذرات سلنیوم به جیره بزهای نر در حال رشد تأثیرات قابل‌توجهی بر ساختار و عملکرد بیضه، کیفیت مایع منی، کاهش نسبت استات به پروپیونات و بهبود عملکرد داشت (۴۹، ۵۰، ۵۳). همچنین، تحقیقات جدید نشان می‌دهد نانو ذرات برخی از فلزات مانند اکسید مس، روی و آهن به‌دلیل حلالیت بالای نانو ذرات و غلظت بالای آن‌ها در محیط، توانایی تولید سریع گاز هیدروژن، تحریک کاهنده‌های سولفات، توانایی تولید یون‌های فلزی با بار مثبت مضاعف و افزایش تقاضا برای اکسیژن شیمیایی محلول (۴۵) برای جمعیت میکروبی شکمبه سمی بوده (۳۸) و مانع از تولید متان در شرایط بی‌هوازی می‌شوند (۱۷، ۵۵، ۵۷). نانو ذرات را می‌توان با استفاده از عصاره‌های گیاهی به شیوه‌ای مقرون‌به‌صرفه و سازگار با محیط زیست تولید کرد (۲۲، ۴۳، ۴۴، ۴۸). قابلیت ماندگاری بالای مولکول‌های زیستی در گیاهان می‌تواند باعث تثبیت نانو ذرات شود (۲۲). از این رو، گیاهان به‌علت فراوانی، عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد و سازگاری با محیط، گزینه‌ای مناسب برای تولید نانو ذرات محسوب می‌شوند (۳۶).

گونه گوش‌بره سفید یا گوش‌بره ایرانی (*Phlomis cancellata* Bunge) گیاهی پایا و یکساله است و به‌وفور در مراتع استان‌های خراسان، گلستان و مازندران یافت می‌شود (۳۷)، که علی‌رغم ارزش دارویی بالا (۲) و داشتن خصوصیات ضد باکتریایی (۱۱) کمتر مورد توجه قرار گرفته است. جنس گوش‌بره (*Phlomis* sp.) متعلق به تیره نعناعیان بوده و دارای ۷۰ گونه گیاهی علفی چند ساله و معطر می‌باشد که تنها در نقاط محدودی از آسیا شامل ایران، افغانستان، ترکمنستان و عراق یافت می‌شود (۴). ارزیابی عصاره به‌دست آمده از پیکر رویشی گیاه گوش‌بره سفید نشان می‌دهد عصاره این گیاه غنی از ترکیبات ترپنی (ژرماکرن دی، مونو ترپن آلفا پینن، بتا کاریو فیلن، بایسیکلو ژرماکرن و بتا سلینن) است (۲، ۳۷). همچنین بررسی عصاره گونه‌های مختلف جنس گوش‌بره، *Phlomis nissolii* (۲۵)، *Phlomis ferruginea* (۱۳)، *Phlomis persica* و *Phlomis oliveri* (۲۴)، *Phlomis chorassanica* (۴۷) و *Phlomis pungens* (۳۱) نشان می‌دهد دو ماده ژرماکرن دی و بایسیکلو ژرماکرن از ترکیبات شاخص گونه‌های متنوع این گیاه می‌باشند.

فناوری نانو در حال توسعه و پیشرفت است و کاربرد هر چه بیشتر آن به‌صورت تخصصی و متنوع می‌تواند ظرفیت بالایی در جهت بهبود تولیدات دامی ایجاد نماید. از سوی دیگر استفاده از نانو ذرات در مطالعات تغذیه‌ای دام می‌تواند بازده رشد و تولیدات دامی را به‌نحو چشم‌گیری افزایش دهد (۴۵). با این حال، اطلاعات و مطالعات انجام‌شده در این زمینه بسیار محدود است (۱). از این رو، با توجه به امکان استفاده از نانو ذرات سنتز شده به روش زیستی در تغذیه دام و با نظر به کمبود اطلاعات در این زمینه تصمیم گرفته شد تا اثر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید

سنتز نانو ذرات نقره به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید در آزمایشگاه مرکزی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام انجام شد (۱۹). جهت تهیه عصاره گیاه گوش‌بره سفید، ابتدا اندام‌های هوایی گیاه گوش‌بره سفید (تهیه‌شده از مناطق اطراف شهر باخرز واقع در استان خراسان رضوی) با آب مقطر به خوبی شستشو داده شد. در ادامه و پس از کامل‌شدن فرآیند خشک‌شدن در دمای اتاق، برگ‌های خشک‌شده گیاه با قیچی و هاون به خوبی پودر شد. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون و در قیف پرکولاسیون انجام شد. بدین‌منظور مقدار ۱ گرم پودر تهیه‌شده از گیاه گوش‌بره سفید با ۱۰۰ سی‌سی آب دیونیزه مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه شیکر هم زده شد. پس از خنک‌شدن، نمونه توسط کاغذ صافی واتمن صاف و به‌منظور حذف کامل ذرات معلق به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره به‌دست‌آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی قرار داده شد (۱۹).

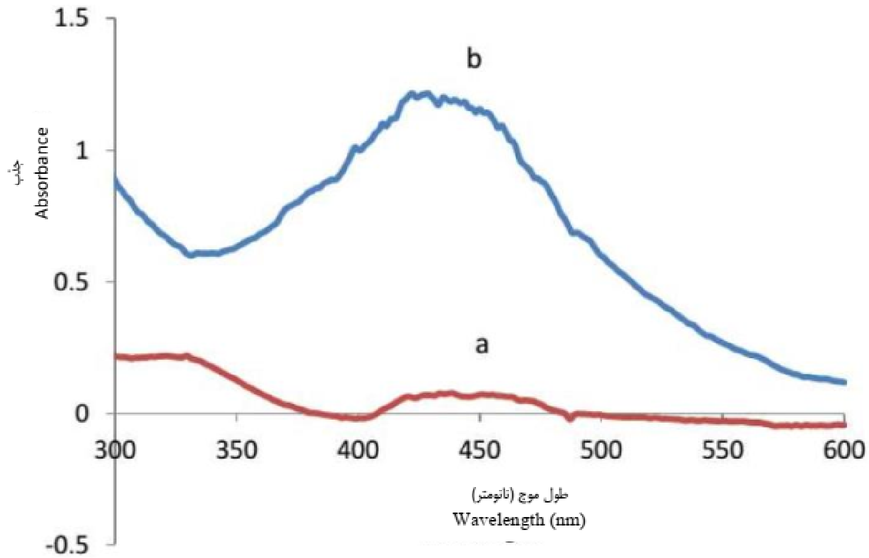
سنتز نانو ذرات به روش زیستی

در ادامه فرآیند سنتز نانو ذرات نقره، یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه‌شده از گیاه گوش‌بره سفید به محلول نیترات نقره (Sigma–Aldrich Chemicals Germany) ۴/۷۶ میلی‌مولار در pH= ۶/۸۴ اضافه گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سانتی‌گراد مورد انکوباسیون قرار گرفت. تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه‌ای پس از گذشت سه دقیقه از انکوباسیون نشان‌دهنده کاهش زیستی یون‌های Ag^+ محلول به Ag^0 بود که خود گواه تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد.

به‌منظور تأیید تشکیل نانو ذرات نقره، از محلول موردنظر توسط اسپکتروفوتومتر فرابنفش-مرئی مدل Shimadzu UV-1800 مجهز به سل کوارتز ۱ سانتی‌متر طیف‌گیری شد. هم‌چنین توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد. به‌علاوه، به‌منظور درک بهتر نانو ذرات نقره سنتز شده از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نیز استفاده شد (۱۹).

مطالعه طیف اسپکتروفتومتری فرابنش-مرئی (UV-Vis):

شکل ۱ طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره سنتز شده بدون اعمال شرایط بهینه را نشان می‌دهد که در طول موج ۴۲۸ نانومتر (رزونانس پلاسمون سطحی مربوط به نانو ذرات نقره) بیشترین میزان جذب را داراست (شکل ۱).

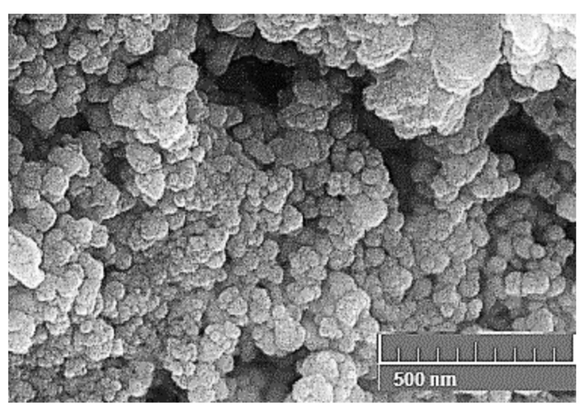


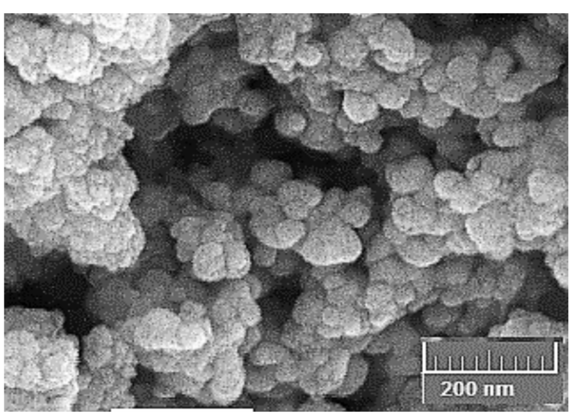
شکل ۱- طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی نانوذرات نقره بدون اعمال شرایط بهینه.

Figure 1- UV-Vis absorption spectrum of Ag nanoparticles, (a) extract (b) extract with Ag.

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (SEM):

توزیع شکل و اندازه نانو ذرات نقره سنتز شده تو سط ت صویر میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد. شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانو ذرات نقره سنتز شده با اعمال تمامی شرایط بهینه‌شده را نشان می‌دهد. تصویر نشان می‌دهد که نانو ذرات به‌دست‌آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آنها بین۱۰و ۳۰ نانومتر است (شکل ۲).



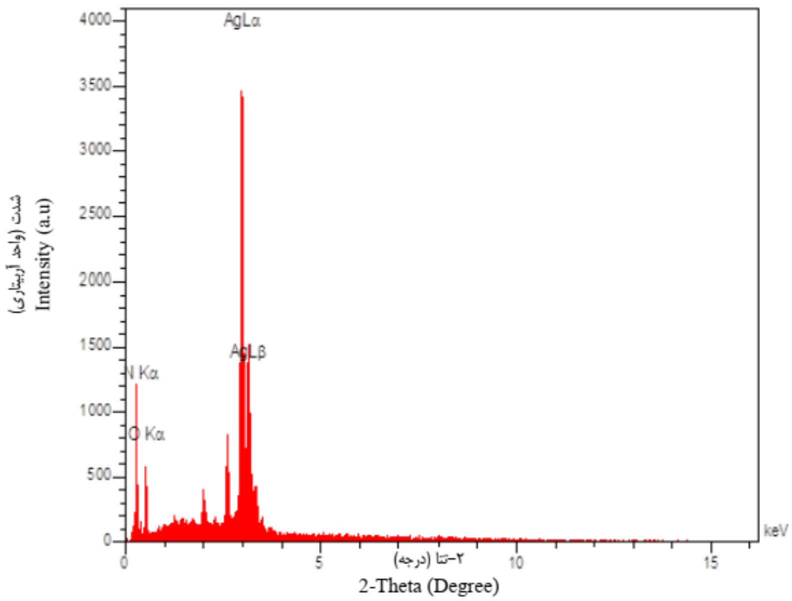


شکل ۲- تصویر نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میکروسکوپ الکترونی. (nm= نانومتر)

Figure 2- SEM micrograph for the biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge. (*nm= nano meter)

بررسی طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX):

به‌منظور درک بهتر نانو ذرات نقره سـنتز شـده از طیف‌سـنجی پراش انرژی پرتو ایکس استفاده شد. شکل ۳ حضور نانو ذرات نقره را تأیید می‌کند.



شکل ۳- تصویر طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نانو ذرات نقره.
Figure 3- EDX spectrum obtained for AgNPs.

آزمون برون‌تنی (*in vitro*) اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز

به‌منظور تعیین اثر سطوح مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر خصوصیات تخمیری جیره گاوهای پر تولید، آزمون تولید گاز بر اساس روش منک و همکاران (۱۹۷۹)، انجام شد (۳۴). تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱- تیمار یک (جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید)، ۲- تیمار دو (جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر)، ۳- تیمار سه (جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر). جیره پایه بر اساس ماده خشک شامل: علوفه (۲۰ درصد سیلوی ذرت و ۲۰ درصد علوفه یونجه) و کنسانتره (۱۶/۵ درصد دانه ذرت، ۱۳/۵ درصد دانه جو، ۱۳/۵ درصد کنجاله سویا، ۷/۰۵ درصد کنجاله کلزا، ۳/۷۵ درصد پودر ماهی، ۱/۳۵ درصد پودر چربی، ۲/۴ درصد پیش مخلوط ویتامینی-معدنی، ۱/۱۱ درصد جوش‌شیرین، ۰/۳۶ درصد دی‌کلسیم‌فسفات، ۰/۲۴ درصد منیزیم، ۰/۱۵ درصد نمک و ۰/۰۹ درصد توکسین بایندر) به نسبت ۴۰ به ۶۰ بود. ترکیب شیمیایی جیره شامل ۱۸ درصد پروتئین‌خام، ۲/۷۶ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک انرژی قابل‌متابولیسم، ۴۱/۱ درصد NFC، ۲۷/۷ درصد NDF، ۱۷/۷ درصد ADF، ۱۹/۲ درصد NDF علوفه‌ای و ۴/۳ درصد عصاره اتری بود.

مایع شکمبه از یک رأس گاو نر هلشتاین با کمک لوله پلاستیکی و پمپ خلاء، قبل از تغذیه صبح جمع‌آوری شد. محتویات شکمبه به‌وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف گردید و سپس به درون بطری در داخل فلاسک عایق‌دار آب گرم (۳۹ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت اطمینان از شرایط بی‌هوازی مایع شکمبه صاف شده گاز دی اکسید کربن به آن تزریق شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم (۳۸/۶ درجه سلسیوس) نگهداری شد. بزاق مصنوعی مطابق روش منک و همکاران (۱۹۷۹) تهیه و با شیرابه شکمبه ۲:۱ (مایع شکمبه: بافر) مخلوط شد (۳۴). نمونه‌های خوراکی با آسیاب با غربال یک میلی‌متری آسیاب شد (۳۵). مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم جیره پایه، ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۰ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه به بطری‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری (برای هر تیمار ۵ تکرار)، اضافه شد. سر بطری‌ها به کمک درپوش پلاستیکی و پوشش آلومینیومی به‌طور کامل بسته و در حمام آب گرم با دمای ۳۸/۶ درجه سلسیوس برای انکوباسیون قرار داده شد. به‌منظور تصحیح

گاز تولید شده ناشی از ذرات باقی‌مانده در مایع شکمبه سه تکرار که بلانک نامیده می‌شود در نظر گرفته شد. فشار گاز تولیدشده در زمان‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون ثبت گردید و به کمک رابطه تئودور و همکاران (۱۹۹۴) حجم گاز تولیدشده محاسبه شد (۵۱). تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک معادله ارسکوف و مکدونالد (۱۹۷۹) ($P= b(1-e^{ct})$) و نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام شد (۴۰). در این معادله فراسنجه b گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، c ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t زمان انکوباسیون (ساعت) و P مقدار گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد. بعد از پایان انکوباسیون، از محیط‌های تخمیر، نمونه‌های مایع شکمبه با هدف تعیین ماده آلی تجزیه‌شده واقعی و اسیدهای چرب فرار کل تهیه شد. ضریب تفکیک‌پذیری (نسبت میلی‌گرم ماده آلی تجزیه‌شده به میلی‌لیتر گاز تولیدی) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۵۲).

$$PF = c – (a–b)/ IVGP$$

در این رابطه، c ماده آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، *a* مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و *b* مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و IVGP گاز تولیدی در ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون است. ماده آلی تجزیه‌شده واقعی نیز به کمک رابطه زیر محاسبه شد (۵۲).

$$OMDe (mg) = c - (a - b)$$

بعد از اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی در طی ساعات نگهداری در حمام آب گرم، محتویات داخل بطری شیشه‌ها به داخل یک بشر انتقال داده شد و توسط محلول شوینده خنثی و حرارت به مدت یک ساعت در دستگاه مجهز به سردکننده شسته شد. سپس محتویات داخل محلول شوینده توسط کاغذ صافی بدون خاکستر تصفیه و باقیمانده توسط آون و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ ساعت خشک شد. با کسر نمودن وزن بوته خالی از بوته با محتویات بعد از آون، مقدار ماده تجزیه‌نشده در هر بطری (a) محاسبه شد. سپس بوته و محتویات داخل آن به کوره انتقال داده شد و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد مقدار خاکستر آن (b) محاسبه شد. با کسر نمودن میزان b از a ماده آلی تجزیه‌نشده برحسب میلی‌گرم محاسبه شد (۵۲). مقادیر توده میکروبی تولیدی و بازده تولید توده میکروبی نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۵۲).

$$MM (mg) = [c - (a - b)] - [NG (ml) \times 2.2]$$

در این رابطه، MM میلی‌گرم توده میکروبی تولیدشده، c ماده آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، *a* مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و *b* مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (میلی‌گرم) و NG میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی و ۲/۲ ضریب استوکیومتری است.

انرژی قابل‌متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) طبق روش منک و استینگس (۱۹۸۸) و قابلیت‌هضم ماده آلی (درصد) طبق روش منک و همکاران (۱۹۷۹)، محاسبه گردید (۳۴، ۳۵).

$$ME (MJ/Kg DM) = 2.2 + 0.136 GP + 0.057 CP + 0.0029 CP^2$$

$$IVOMD (\%) = 14.88 + 0.889 GP + 0.45 CP + 0.0651 XA$$

DM: ماده خشک، CP: درصد پروتئین‌خام، XA: درصد خاکستر، GP: میلی‌لیتر گاز تولیدشده از ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون است.

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله گتاچیو و همکاران (۲۰۰۰) تخمین زده شد (۱۵).

$$SCFA (mmol/200 mg DM) = 0.0222 GP-0.00425$$

در این رابطه GP، گاز خالص تولیدی پس از ۲۴ساعت (میلی‌مول/۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) است.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، آنالیز واریانس شدند. نتایج حاصل از آزمایش با مدل GLM برنامه آماری SAS (نسخه ۹/۱)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد استفاده شد. مدل آماری طرح به شکل زیر بود:

$$Yij= \mu + Ti + \varepsilon ij$$

که Yijk= مشاهده مربوط به i امین تیمار در j امین تکرار، μ= اثر میانگین، Ti= اثر i امین تیمار، εij= اثر باقی‌مانده می‌باشد.

نتایج و بحث

تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره بر تولید گاز و فراسنجه‌های آن

ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر (b) و نرخ تولید گاز (c) در شرایط افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید (۰: تیمار یک، ۱۲۵ میکروگرم: تیمار دو و ۲۵۰ میکروگرم: تیمار سه در میلی‌لیتر) به جیره حاوی ۴۰ درصد علوفه و ۶۰ درصد مواد متراکم طی ۹۶ ساعت انکوباسیون و همچنین حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر /میلی‌گرم ماده خشک) در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) در جدول ۱ و شکل ۴ آورده شده است. افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر و نرخ تولید گاز نداشت (P>۰/۰۵). کمترین (۵۳/۷۳±۳/۰۸ میلی‌لیتر) و بیشترین (۵۵/۹۰±۲/۶۶ میلی‌لیتر) ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر به‌ترتیب در تیمارهای ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره و تیمار شاهد، مشاهده شد (جدول ۱). نرخ تولید گاز در تیمار حاوی ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره کمترین (۰/۱۰۰۰±۰/۰۰۲۴ میلی‌لیتر در ساعت) و در تیمار شاهد بیشترین (۰/۱۰۲۹±۰/۰۰۹۲ میلی‌لیتر در ساعت) مقدار را از خود نشان داد (جدول ۱). حجم گاز تجمعی تولیدی

(میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) تحت تأثیر افزایش مقدار نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی، قرار نگرفت (P>۰/۰۵). در ساعات مختلف انکوباسیون، کمترین و بیشترین حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) به‌ترتیب مربوط به تیمارهای حاوی ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره و تیمار شاهد، بود (جدول ۱).

جدول ۱- اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر

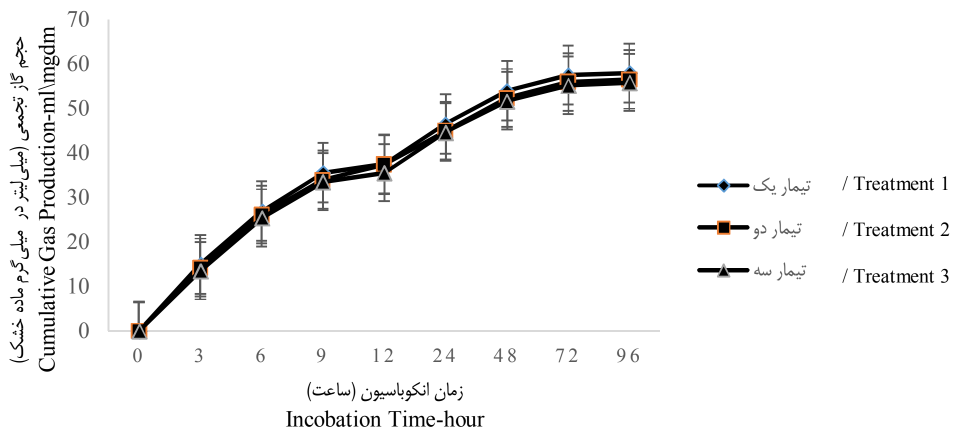
Table1- Effect of different levels of biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge* on gas production and fermentation parameters

متغیرها Parameters	تیمارهای آزمایشی ۱ Experimental Treatments[1]			SEM[4]	P-value
	تیمار یک Treatment 1	تیمار دو Treatment 2	تیمار سه Treatment 3		
	فراسنجه‌های تخمیر Fermentation Parameters				
b (ml/200mgDM)[2]	55.90±2.66	54.23±0.82	53.73±3.08	1.2	0.43
c (ml/h)[3]	0.1029±0.0092	0.1012±0.0067	0.1000±0.0024	0.0033	0.82
	(میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) حجم گاز تجمعی Cumulative Gas Production (ml/200mg of DM)				
12	37.55±1.41	37.51±1.07	37.15±1.24	0.43	1.01
24	46.59±1.87	45.03±1.50	44.73±3.37	1.19	0.51
48	54.02±2.38	52.46±0.58	51.76±3.12	1.14	0.39
72	57.60±2.50	56.00±.0.94	55.28±2.83	1.20	0.40
96	58.02±3.06	56.59±1.07	55.91±2.78	1.23	0.48

[۱] تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر؛ [۲] b: ظرفیت تولید گاز از بخش قابل تخمیر؛ [۳] c: نرخ تولید گاز؛ [۴] SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1]Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs. [2]b: The gas production from the fermentable fraction ml/200mgDM; [3]c: Rate constant of gas production during incubation (ml/h); [4] SEM: Standard Error of Mean.

دی‌اکسیدکربن و متان بخش‌های عمده گاز تولیدشده در شکمبه را شامل می‌شوند (۱۰). کاهش جمعیت پروتوزوآیی شکمبه، تحریک تولید پروپیونات، کاهش تولید هیدروژن و مهار مستقیم باکتری‌های تولیدکننده گاز متان از جمله راهکارهایی است که می‌توان از طریق افزودنی‌های خوراکی میزان تولید گاز متان در شکمبه را کاهش داد (۸). نانو ذرات نقره دارای ویژه‌گی‌های متوقف‌کننده و از بین‌برنده باکتریایی می‌باشند. در مقیاس اتمی، نقره توانایی جذب اکسیژن را دارد و می‌تواند به‌عنوان یک کاتالیزور برای انجام واکنش اکسیداسیون، عمل کند. اکسیژن اتمی جذب‌شده در سطح نقره با گروه‌های تیول اطراف سطح باکتری‌ها و ویروس‌ها واکنش می‌دهد که این واکنش منجر به برداشت اتم‌های هیدروژن خواهد شد. تحت این شرایط باکتری توانایی تنفس را از دست می‌دهد. در نتیجه این اختلال که کانال تنفسی نام دارد، باکتری از بین می‌رود (۱۸). همچنین دارابودن ویژه‌گی‌های کاتالیزوری و وجود اکسیژن فعال در نقره باعث اکسید شدن مواد ژنتیکی باکتریایی و ویروسی می‌شود. هر چند که ساز و کار اتصال نانو ذرات نقره به DNA باکتریایی به‌طور کامل درک نشده است با این حال می‌توان گفت نانو ذرات نقره از طریق جلوگیری از باز شدن رشته DNA باکتریایی در خلال فرآیند همانندسازی DNA، مانع تکثیر باکتری‌ها می‌شود (۹، ۲۶، ۲۸ و ۵۴). با توجه به اینکه سنتز نانو ذرات نقره از عصاره گیاه گوش‌بره سفید برای اولین بار انجام می‌شود و تاکنون مطالعه‌ای با استفاده از نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر شرایط تخمیری محیط شکمبه صورت نگرفته است، می‌توان به‌منظور توجیه و تفسیر بهتر نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، از نتایج حاصل از تأثیر دیگر نانو ذرات فلزی بر شرایط تخمیری محیط شکمبه، استفاده کرد.



شکل ٤– اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر روند تولید گاز

Figure 2- Effect of different levels of biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge* on cumulative gas production trend

تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گوش بره.

Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs.

به‌دلیل مشابهت شیمیایی نقره با فلزاتی همچون روی، کروم و کبالت، تأثیر نقره بر تنوع زیستی میکروبی مسیر هضمی و عملکرد آن‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی میزبان (سطح ایمنی، فعالیت آنزیم‌های هاضم و ساختار روده‌ای) مشابه این فلزات خواهد بود (۱۲، ۲۳، ۲۷). مشابه نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر، سارکر و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند افزایش غلظت نانو ذرات اکسید روی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در گرم تأثیر معنی‌داری بر مقدار کل گاز تولیدی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون ندارد (۴۶). از سوی دیگر نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد حجم گاز تجمعی تولیدی (میلی‌لیتر/میلی‌گرم ماده خشک) در ۲۴ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر افزایش مقدار نانو ذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاهان اکالیپتوس نیلی (*Eucalyptus globulus*)، گواوا (*Psidium guajava*)، نانو ذرات اکسید روی سنتز شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) و نانو ذرات مس سنتز شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا، آب بشقابی (*Centella asiatica*) و چریش (*Mangifera indica*) از صفر تا ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار نگرفت (۴۵). از آنجائیکه شدت تأثیرگذاری نانو ذرات نقره بر جمعیت میکروبی محیط شکمبه وابسته به غلظت نانو ذرات، اندازه آن‌ها و بزرگی جمعیت میکروبی دارد (۳، ۴۵) و با توجه به اینکه هیچ یک از مقادیر نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید استفاده شده در این آزمایش قادر به کاهش معنی‌دار حجم کل گاز تولیدی نبوده‌اند، لذا به‌نظر می‌رسد مقادیر نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید استفاده شده در این آزمایش به‌منظور کاهش معنی‌دار مقدار گاز تجمعی تولیدی، کافی نبوده است. با این حال، درک بهتر نحوه تأثیر مقادیر نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر وضعیت تولیدی حیوان نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره بر قابلیت‌هضم ظاهری و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه‌ای

نتایج مربوط به اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک و ماده آلی، مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی، انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب فرار، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی در جدول ۲ گزارش شده است. در این آزمایش بین تیمارهای مختلف از نظر قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). بین تیمارهای آزمایشی به‌لحاظ انرژی قابل‌متابولیسم، اسیدهای چرب فرار، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).

جدول ۲- اثر افزودن مقادیر مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید بر قابلیت‌هضم ماده خشک و ماده آلی، مقدار ماده آلی تجزیه‌شده واقعی، انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی و بازده تولید توده میکروبی

Table 2- Effect of different levels of biosynthesized AgNPs obtained by mediation of *Phlomis cancellata Bunge* on dry and organic matter digestibility, metabolisable energy, short chain fatty acids, partitioning factor, microbial biomass production and microbial biomass production efficiency

متغیرها Parameters	تیمارهای آزمایشی [۱] Experimental Treatments			SEM[10]	P-value
	تیمار یک Treatment 1	تیمار دو Treatment 2	تیمار سه Treatment 3		
IVDMD[2]	72.55	72.10	67.03	1.96	0.12
IVOMD[3]	77.18	73.98	72.92	1.31	0.07
TIVOMD[4]	143.30	135.40	133.60	3.50	0.13
ME[5]	10.50	10.28	10.24	0.16	0.51
SCFA[6]	0.98	0.95	0.94	0.02	0.51
PF[7]	2.57	2.39	2.29	0.07	0.11
MB[8]	116.85	108.80	104.52	3.84	0.11
MBE[9]	81.50	80.34	78.56	1.76	0.51

[۱] تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر؛ [۲] IVDMD: قابلیت‌هضم ماده خشک (درصد)؛ [۳] IVOMD: قابلیت‌هضم ماده آلی (درصد)؛ [۴] TIVOMD: مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی (میلی‌گرم/گرم ماده خشک)، [۵] ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول/کیلوگرم ماده خشک)، [۶] SCFA: اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (میلی‌مول/میلی‌گرم ماده خشک)، [۷] PF: شاخص بخش‌پذیری (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، [۸] MB: تولید توده میکروبی (میلی‌گرم/گرم ماده خشک)، [۹] MBE: بازده تولید توده میکروبی (میلی‌گرم/میلی‌گرم)، [۱۰] SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

[1]Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs. [2]IVDMD: *in vitro* dry matter digestibility (%). [3]IVOMD: *in vitro* organic matter digestibility (%).[4]TIVOMD: true *in vitro* organic matter digestibility (mg/gDM). [5]ME: metabolizable energy (MJ/KgDM). [6]SCFA: short chain fatty acids (mM/mgDM). [7]PF: portioning factor (mg/ml). [8]MB: microbial biomass (mg/gDM). [9]MBE: microbial biomass efficiency (mg/mg). [10] SEM: Standard Error of Mean.

نظر به اینکه هیچ‌گونه گزارشی راجع به اثر نانو ذرات نقره بر جمعیت میکروبی شکمبه و فراسنجه‌های تخمیری وجود ندارد و با توجه به شباهت شمیایی نقره با دیگر فلزات (۱۲، ۲۷)، نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، با نتایج حاصل از تأثیر دیگر نانو ذرات فلزی بر شرایط تخمیری محیط شکمبه، مقایسه می‌شود. سای رام کومار (۲۰۱۷) گزارش کرد که نانو ذرات آهن فاقد الکترون ظرفیت سنتز شده از عصاره گیاهان چریش، انبه (*Mangifera indica*) و میخک صد پر (Syzygium aromaticum)، نانو ذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاهان اکالیپتوس آبی و گواوا و همچنین نانو ذرات اکسید مس سنتز شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا، آب بشقابی و چریش، تأثیر معنی‌داری بر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و و مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی ندارند (۱۴، ۱۷، ۲۹، ۴۵). سارکر و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کردند که افزایش نانو ذرات اکسید روی در تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت‌هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و و مقدار ماده آلی هضم‌شده واقعی نداشته است (۴۶). با این حال، عدم تأثیرگذاری معنی‌دار نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه گوش‌بره سفید بر قابلیت‌هضم ممکن است ناشی از عواملی هم‌چون غلظت، ظرفیت سطح، اندازه و دیگر خصوصیات نانو ذرات نقره باشد که بر نتایج آزمایش حاضر اثرگذار بوده است. زیرا نانو ذارت به‌منظور اثرگذاری بر تخمیر شکمبه‌ای باید در محیط شکمبه پخش شوند و با میکروارگانیسم‌های شکمبه تماس برقرار نمایند (۴۱، ۴۵).

مطابق نتایج آزمایش حاضر، عبدالخلیل و البردنی (۲۰۱۸) گزارش کردند، که مکمل‌کردن تیمارهای آزمایشی با مقادیر افزایشی نانو ذرات کبالت تأثیر معنی‌داری بر انرژی قابل‌متابولیسم (مگاکالری بر گرم) ندارد (۱). هم‌چنین مشابه نتایج آزمایش حاضر، سای رام کومار (۲۰۱۷)، عنوان کرد که نانو ذرات آهن فاقد الکترون ظرفیت سنتز شده از عصاره گیاهان چریش، انبه و میخک صد پر، نانو ذرات اکسید آهن سنتز شده از عصاره گیاهان اکالیپتوس آبی و گواوا و همچنین نانو ذرات اکسید مس سنتز شده از عصاره گیاهان آلوئه‌ورا، آب بشقابی و چریش تأثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار نداشتند (۴۵). حجم گاز تولیدی نشان‌دهنده تخمیر مواد خوراکی به اسیدهای چرب فرار است، در نتیجه مقدار گاز تولیدی در تیمارهای آزمایشی، ارتباط مستقیمی با اسیدهای چرب فرار دارد (۶). یون و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که با توجه به حساس‌تر بودن ساختار غشای خارجی باکتری‌های گرم مثبت به نانو ذرات نقره، این ترکیبات می‌توانند بر باکتری‌های گرم مثبت در محیط به صورت انتخابی، تأثیرگذار باشند (۵۶). مهار باکتری‌های گرم مثبت در محیط شکمبه، تولید هیدروژن، متان و نسبت مولی استات به پروپیونات را کاهش می‌دهد (۵، ۱۶، ۲۱، ۳۲).

مطابق جدول ۲، شاخص بخش‌پذیری، تولید توده میکروبی بازده آن تحت تأثیر مقادیر افزایش نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید در تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. شاخص بخش‌پذیری بیانگر این واقعیت است که چه مقدار از ماده آلی

هضم شده در شکمبه، به سمت تولید اسیدهای چرب فرار یا تولید توده میکروبی رفته است. شاخص بخش‌پذیری بالاتر نشان‌دهنده این موضوع است که مواد هضم‌شده به جای تولید گاز به سمت تولید توده میکروبی هدایت شده و بازده تولید توده میکروبی آن بهبود یافته است (۶). در آزمایش حاضر روند تغییرات توده میکروبی تولید شده، همسو با مقادیر شاخص بخش‌پذیری بود. یعنی کاهش تولید توده میکروبی با شاخص بخش‌پذیری کمتر هماهنگ بود (۳۰). از سوی دیگر نرخ تخمیر سوبسترا، همبستگی بالایی با نرخ رشد میکروارگانیسم‌ها دارد، به‌گونه‌ای که تخمیر سریع سوبسترا باعث تولید توده میکروبی بیشتری می‌شود (۳۹). سارکر و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که همزمان با افزایش نانو ذرات روی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ (میکروگرم در گرم) در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با تیمار شاهد، شمار توده‌های میکروبی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۴۶). سارکر و همکاران (۲۰۱۸)، در تفسیر این نتایج، اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات روی را به عنوان مسئول بروز این پدیده، ذکر کردند (۴۶). از این رو، تولید توده میکروبی کمتر در تیمارهای آزمایشی حاوی نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش‌بره سفید نشان‌دهنده محدودشدن فعالیت میکروبی به‌علت وجود اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره، کاهش دسترسی به کربوهیدارت‌های سهل‌الهضم (به‌عنوان انرژی قابل‌متابولیسم قابل تخمیر) می‌باشد.

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط برون‌تنی

Table 3- Pearson correlation coefficients of dry matter digestibility, organic matter digestibility and partitioning factor with cumulative gas production during different hours of *in vitro* incubation.

متغیرها Parameters	زمان‌های انکوباسیون Incubation Times 12	24	48	72	96
			تیمار یک[1] Treatment 1		
IVDMD[2]	-0.932*	-0.946**	-0.239	0.140	0.293
IVOMD[3]	-0.946**	-0.979**	-0.366	-0.168	-0.009
PF[4]	-0.857	-0.876	-0.603	-0.257	-0.500
			تیمار دو Treatment 2		
IVDMD	-0.622	-0.620	-0.521	-0.507	-0.619
IVOMD	-0.927*	-0.924*	-0.894*	-0.881*	-0.925*
PF	-0.994**	-0.995**	-0.983**	-0.978**	-0.996**
			تیمار سه Treatment 3		
IVDMD	0.326	0.540	0.343	0.427	0.625
IVOMD	0.211	0.516	0.334	0.256	0.027
PF	-0.402	-0.519	-0.296	-0.384	-0.588

* P < ۰/۰۵ و ** P<۰/۰۱

[1] تیمار ۱: جیره پایه فاقد نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید، تیمار ۲: جیره پایه به اضافه ۱۲۵ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر، تیمار ۳: جیره پایه به اضافه ۲۵۰ میکروگرم نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی از عصاره گیاه گوش بره سفید در میلی‌لیتر؛ [2] IVDMD: قابلیت‌هضم ماده خشک (درصد)؛ [3] IVOMD: قابلیت‌هضم ماده آلی (درصد)؛ [4] PF: شاخص بخش‌پذیری (میلی‌گرم/میلی‌لیتر).

* P<0.05; ** P<0.01

[1]Treatment 1: basal diet, Treatment 2: basal diet + 125µg/ml AgNPs, Treatment 3: basal diet + 250µg/ml AgNPs. [2]IVDMD: *in vitro* dry matter digestibility (%); [3]IVOMD: *in vitro* organic matter digestibility (%); [4]PF: portioning factor (mg/ml).

تبیین ضرایب همبستگی بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون

ضرایب همبستگی بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط برون‌تنی در جدول ۳ نشان داده شده است. در تیمار یک همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات ۱۲ و ۲۴ مشاهده شد (P<۰/۰۵). هیچ‌گونه همبستگی معنی‌دار بین شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون مربوط به تیمار یک وجود نداشت. در تیمار دو همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶) ثبت گردید (P<۰/۰۵). قابلیت‌هضم ماده خشک، قابلیت‌هضم ماده آلی و شاخص بخش‌پذیری همبستگی معنی‌داری با حجم گاز

تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون در شرایط برون‌تنی در تیمار سه نداشتند.

بلومل و ارسکوف (۱۹۹۳) گزارش کردند که همبستگی بالایی بین تولید گاز، قابلیت‌هضم ماده خشک و قابلیت‌هضم ماده آلی وجود دارد (۶). وجود اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره در تیمارهای آزمایشی حاوی نانو ذرات نقره سنتز شده باعث تولید توده میکروبی کمتر، محدودشدن فعالیت میکروبی، کاهش دسترسی به کربوهیدارت‌های سهل‌الهضم (به عنوان انرژی قابل‌متابولیسم قابل تخمیر) و در نهایت کاهش شاخص بخش‌پذیری می‌گردد. از این رو می‌توان گفت وجود همبستگی منفی و معنی‌دار بین قابلیت‌هضم ماده آلی، شاخص بخش‌پذیری و حجم گاز تجمعی تولیدی در ساعات مختلف انکوباسیون (۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶) در تیمار دو بیان‌کننده این واقعیت است که قابلیت‌هضم ماده آلی و شاخص بخش‌پذیری همزمان با افزایش مقدار حجم گاز تجمعی تولیدی پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون به‌دلیل وجود اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری کلی

از نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر اینچنین استنباط می‌شود که مکمل‌کردن مقادیر افزایشی نانو ذرات نقره توانست فراسنجه‌های تولید گاز در خوراک پایه را تغییر دهد. بدیهی است طراحی آزمایشات میکروبی دیگر با مقادیر متنوع‌تری از نانو ذرات نقره سنتز شده به روش زیستی به‌منظور دستیابی به درک بهتری از نحوه عملکرد این نانو ذرات در محیط شکمبه ضروری است. همچنین پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در رابطه با تأثیر نانو ذرات نقره بر عملکرد نشخوارکنندگان (گاو و گوسفند) در سیستم‌های پرورشی مختلف (پرواری و شیری) با توجه به جنس دام و مرحله تولیدی در شرایط درون‌تنی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده از محل اعتبارات معاونت پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام می‌باشد.

Refrences

1. Abd El-Galil, E. R. I., and N. E. Y. El-Bordeny. 2018. Evaluation of nanocobalt particles addition in ruminant rations by in vitro gas production. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds, 21(1):91-102.
2. Akhlaghi, H., and A. Motevalizadeh Kakh'ky. 2010. Volatile Constituents of Phlomis cancellata Bunge. A Labiate Herb Indigenous in Iran Journal of Essential Oil Research, 13(5):134-137. (In Persian).
3. Arabi, F., M. Imandar, M. Negahdary, M. Imandar, M. T. Noughabi, H. Akbari-dastjerdi, and M. Fazilati. 2012. Investigation anti-bacterial effect of zinc oxide nanoparticles upon life of Listeria monocytogenes. Annals of Biological Research, 7:3679-3685. (In Persian)
4. Bellamy, D., and A. Pfister. 1992. World medicine: plants, patients and people. Oxford: Blackwell Publishers, 1321p.
5. Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T. A. McAllister, and K. A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Animal Feed Science and Technology, 145:209-228.
6. Blummel, M., and E. R. Orskov. 1993. Composition of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting food intake in cattle. Animal Feed Science and Technology, 40:109-119.
7. Buxton, D. R., and D. D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. The Journal of Nutrition, 127(5):814-818.
8. Castro-Montoyaa, J., S. De Campeneere. G. Van Ranst, and V. Fievez. 2012. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on in vitro methane and VFA production. Animal Feed Science and Technology, 176:47-60.
9. Cui, L., P. Chen, S. Chen, Z. Yuan, C. Yu, B. Ren, and K. Zhang. 2013. In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. Analytical Chemistry, 85:5436-5443.
10. Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
11. Deylamsalehi, M., M. Mahdavi, A. Motavalizadehkakhky, M. Akbarzadeh, J. Mahmudi, S. F. Mirahmadi, Z. Ebrahimi, and F. Abedi. 2013. Chemical compositions and antimicrobial activity of essential oil of Phlomis cancellata Bunge. From Mazandaran. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 16(4):555-562. (In Persian).
12. Fondevila, M. 2010. Handbook of Potential use of silver nanoparticles as an additive in animal feeding, 325-334.
13. Formisano, C., F. Senatore, M. Bruno, and G. Bellone. 2006. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Phlomis ferruginea ten. Growing wild in Southern Italy. Flavour and Fragrance Journal, 21:848-851.
14. García-González, R., S. López, M. Fernández, and J. S. González. 2006. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). International Congress Series, 1293:172-175.

15. Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2000. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. British Journal of Nutrition, 84:73-83.
16. Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2002. Tropical browses: content of phenolic compounds,in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acids and invitro gas production. Journal of Agricultural Science, 139:341-352.
17. Gonzalez-Estrella, J., R. Sierra-Alvarez, and J. A. Field. 2013. Toxicity assessment of inorganic nanoparticles to acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic activity in anaerobic granular sludge. Journal of Hazardous Materials, 260:278-285.
18. Hartemann, P., P. Hoet, A. Proykova, T. Fernandes, A. Baun, W. De Jong, J. Filser, A. Hensten, K. Kneuer, J. V. Maillard, H. Norppa, M. Scheringer, and S. Wijnhoven. 2015. Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Materials Today, 18:122-123.
19. Heidari, S., and M. Hosseinpour Zaryabi. 2018. Response Surface Methodology for Optimization of Green Silver Nanoparticles Synthesized via Phlomis Cancellata Bunge Extract. Analytical and Bioanalytical Chemistry Research, 5(2):373-386.
20. Hino, T., and N. Asanuma. 2003. Suppression of ruminal methanogenesis by decreasing the substrates available to methanogenic bacteria. Nutrition Abstract and Reviews (Series B), 73:1-8.
21. Ipharraguerre, I. R., and J. H. Clark. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: A review. Animal Feed Science and Technology, 106:39-57.
22. Kavitha, K. S., S. Baker, D. Rakshith, H. U. Kavitha, H. C. Yashwantha Rao, B. P. Harini, and S. Satish. 2013. Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. International Research Journal of Biological Sciences, 2(6):66-76.
23. Khafipour, E., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. Journal of Dairy Science, 92:1712-1724. (In Persian).
24. Khalilzadeh, M., A. Rustaiyan, S. Masoudi, and M. Tajbakhsh. 2005. Essential oils of *Phlomis persica Boiss*. and *Phlomis olivieri Benth*. from Iran. Journal of Essential Oil Research, 17(6):624-625. (In Persian).
25. Kirimer, N., K. Baser, and M. Kurkcuoglu. 2006. Composition of the Essential Oil of Phlomis nissolii L. Journal of Essential Oil Research, 12:12-16.
26. Lara, H. H., N. V. Ayala-Nunez, L. C. I. Turrent, and C. R. Padilla. 2009. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26:615-621.
27. Li, B. T., A. G. Van Kessel, W. R. Caine, S. X. Huang, and R. N. Kirkwood. 2001. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. Canadian Journal of Animal Science, 81:511-516.
28. Li, W. R., X. B. Xie, Q. S. Shi, S. S. Duan, Y. S. Ouyang, and Y. B. Chen. 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. Biometals, 24:135-141.
29. Luna-delRisco, M., K. Orupõld, and H. C. Dubourguier. 2011 Particle-size effect of CuO and ZnO on biogas and methane production during anaerobic digestion. Journal of Hazardous Materials, 189(1):603-608.
30. Makkar, H. P. S. 2005. In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. Animal Feed Science and Technology, 123:291-302.
31. Masoudi, S. H., A. Rustaiyan, P. Azar, and K. Larijani. 2006. Composition of the Essential Oils of Cyclotrichium straussii and Phlomis pungens Willd. from Iran. Journal of Essential Oil Research, 34(5):134-137.
32. McGuffey, R. K., L. F. Richardson, and J. I. D. Wilkinson. 2001. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. Journal of Dairy Science, 84(E. Suppl.): E194-E203.
33. McSweeney, C., and R. Mackie. 2012. Micro-organisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy, Background study -61.
34. Menke, K. H., L. A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. The Journal of Agricultural Science, 93:217-222.
35. Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal research and development, 28:7-55.
36. Mittal, A. K., Y. Chisti, and U. C. Banerjee. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnology Advances, 31(2):346-56.
37. Morteza-Semnani, K., K. Moshiri, and M. Akbarzadeh. 2006. Essential oil composition of Phlomis cancellata Bunge. Journal of Essential Oil Research, 18(6):672-673. (In Persian).
38. Mortimer, M., K. Kasemets, and A. Kahru. 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa Tetrahymena thermophila. Toxicology, 269(2):182-189.
39. Noeck, J. E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A Review. Journal

of Dairy Science, 71:2051-2069.
40. Ǿrskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements Weighed according to the rate of passage. The Journal of Agricultural Science, 92:499-503.
41. Parnian Khaje Dizaj, F., A. Taghizadeh, G. A. Moghaddam, and H. Janmohammadi. 2010. Use of in Vitro Gas Production Technique for Evaluation of Nutritive Parameters of Barley and Corn Grain Treated by Different Microwave Irradiation Times. Journal of Animal Science Research, 21(1):16-27. (In Persian).
42. Rajendran, R. 2013. Application of nano minerals in animal production system.Research. Journal of Biotechnology, 8(3):1-3.
43. Rajeshkumar, S., C. Malarkodi, G. Gnanajobitha, K. Paulkumar, M. Vanaja, C. Kannan, and G. Annadurai. 2013. Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using Turbinaria conoides and its characterization. Journal of Nanostructure in Chemistry, 3:44-50.
44. Sadeghi, B., A. Rostami, and S. S. Momei. 2015. Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Seed Aqueous Extract of Pistacia atlantica and Its Antibacterial Activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy, 134:326-332. (In Persian).
45. Sai Ram Kumar, S. 2017. Green synthesis of nanoparticles using plant extracts and their effect on rumen fermentation in vitro. Thesis.
46. Sarker, N. C., F. Keomanivong, M. D. Borhan, S. Rahman, and K. Swanson. 2018. In vitro evaluation of nano zinc oxide (nZnO) on mitigation of gaseous emissions. Journal of Animal Science and Technology, 60:27.
47. Sarkhail, P., G. Amin, M. Surmaghi, and A. Shafiee. 2005. Composition of the volatile oils of Phlomis lanceolata Boiss. & Hohen., Phlomis anisodonta Boiss. and Phlomis bruguieri Desf. from Iran. Flavor and Fragrance Journal, 20:327-329.
48. Senapati, S., A. Syde, S. Moeez, A. Kumar, and A. Ahmah. 2012. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga Tetraselmis kochinensis. Material Letters, 2:275-281.
49. Shi, L., W. Xun, W. Yue, C. Zhang, Y. Ren, Q. Liu, Q. Wang, and L. Shi. 2011(a). Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. Animal Feed Science and Technology, 163(2):136-142.
50. Shi L., R. J. Yang, W. B. Yue, W. J. Xun, C. X. Zhang, Y. S. Ren, L. Shi, and F. L. Lei. 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. Animal Reproduction Science, 118(2):248-254.
51. Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48:185-197.
52. Tomkins, N. W., S. E. Denmanb, P. Pilajunc, M. Wanapatc, C. S. McSweeney, and R. Elliot. 2015. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensinin beef cattle feda tropical grasshay. Animal Feed Science and Technology, 200:25-34.
53. Xun, W., L. Shi, W. Yue, C. Zhang, Y. Ren, and Q. Liu. 2012. Effect of high-dose nano selenium and selenium–yeast on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. Biological Trace Element Research, 150(1-3):130-136.
54. Yang, W., C. Shen, Q. Ji, A. H. Wang, J. Q. Liu, and Z. Zhang. 2009. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. Nanotechnology, 2:2121-2134.
55. Yang, Z. P., and L. P. Sun. 2006. Effects of nanometer ZnO on growth performance of early weaned piglets. Journal of Shanxi Agriculture Science, 3:024.
56. Yoon, K. Y., J. H. byeon, J. H. Park, and J. Hwang. 2007. Susceptibility contrants of Eschericia coli and Bacillus subtillis to silver and copper nanoparticles. Science of the Total Environment, 373:572-575.
57. Zhisheng, C. J. 2011. Effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation in vitro. Chinese Journal of Animal Nutrition, 8:023.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 4, Winter 2022, p. 475-488

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، ص. ۴۸۸-۴۷۵

Effect of Green Silver Nanoparticles Synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* Extract on *in vitro* Ruminal Fermentation

Elias Ibrahimi Khoram Abadi[1*], Mohsen Kazemi[2], Somayeh Heydari[3]
Submitted: 25-02-2019
Accepted: 25-01-2021

Ibrahimi Khoram Abadi, E., M. Kazemi, and S. Heydari. 2022. Effect of Green Silver Nanoparticles Synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* Extract on *in vitro* Ruminal Fermentation. Iranian Journal of Animal Science Research 13(4):475-488.

Introduction The anaerobic microbial fermentative digestion of feedstuffs in the rumen is not efficient. The gases are considered as waste products of rumen fermentation and also pollutants of the environment. Recent studies indicated that some metal nanoparticles (NPs) were toxic to rumen microbial population and inhibit methane production in anaerobic conditions. Plant extracts can be used to produce cost effective and eco-friendly green nanoparticles. *Phlomis cancellata Bunge* with Persian names Gushbarre sefid has high medicinal value and antibacterial properties and distributed dramatically in Khorasan, Mazandaran and Golestan. Hence, there is potential of using bio-synthesized nanoparticles in ruminant nutrition. However, there is not enough information regarding the effect of green nanoparticles on runminal condition. Therefore, the present investigation was carried out to study the effect of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract on rumen fermentation in vitro.

Materials and methods Synthesis of sliver nanoparticles was prepared by adding of 1 ml of the aqueous extract to 4.76 mM sliver nitrate solution (pH= 6.84) allowed to react at 77 °C for 24.79 min in the dark to minimize the photo activation of silver nitrate. The color change of solution from yellow to brown after 3 min of incubation is indicative of the bioreduction of Ag^+ ions in the solution to Ag°. Effects of increasing the concentration of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract (0, 125 and 250 µg/ml) on rumen fermentation were evaluated using *in vitro* gas production technique. Gas production volumes were recorded at 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 and 96 h of incubation and then gas production kinetic was estimated. The obtained data from gas production at 24 h after incubation were used for estimation of digestible dry and organic matter, metabolisable energy, short chain fatty acids, partitioning factor, microbial biomass production and microbial biomass production efficiency.

Results and Discussion The increasing level of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract did not significantly affect *in vitro* potential of gas production and gas production rate. For the cumulative gas production, no significant difference was found among the treatments. The lowest and highest in vitro potential of gas production, gas production rate and cumulative gas production was recorded for treatments 3 and 1, respectively. Silver nanoparticles exhibit unique bacteriostatic and bactericidal properties. At the atomic level, silver has the ability to absorb oxygen and acts as an oxidation catalyst. Atomic oxygen absorbed on the silver surface reacts with the thiol groups surrounding the surface of bacteria and viruses and removes hydrogen atoms. The bacterium loses respiration ability by disruption of the so-called respiratory channel, which results in bacterial death. The apparent *in vitro* dry matter digestibility and organic matter digestibility and true *in vitro* organic matter digestibility, were not significantly affected by addition of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract. Addition of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract failed to affect metabolisable energy, short chain fatty acids, partitioning factor, microbial biomass

1- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.
*Corresponding Author Email: Eliiass378@gmail.com
Doi:10.22067/ijasr.2021.38202.0

production and microbial biomass production efficiency. However, the lack of significant effect of the synthesized silver nanoparticles on the digestibility may be due to factors such as concentration, surface capacity, size, and other properties of silver nanoparticles. For treatment 1, the cumulative gas production over 24 and 48 h was negatively correlated apparent *in vitro* dry matter digestibility and organic matter digestibility. There was significant negative correlation between apparent *in vitro* organic matter digestibility and partitioning factor with cumulative gas production during hours of incubation for treatments 2. No significant correlation was found between apparent in vitro dry matter digestibility and organic matter digestibility and partitioning factor with the volume of cumulative gas produced during different incubation hours in for treatments 3.

Conclusion Supplementing of green silver nanoparticles synthesized via *Phlomis cancellata Bunge* extract could modify the characteristics of gas production and fermentation parameters basal diet and reduce the side effects of the anaerobic microbial fermentation. However, additional microbial studies with different level of green silver nanoparticles are necessary to determine the mode of action. Additionally, further *in vivo* work is needed to assess the effect of green silver nanoparticles inclusion on animal performance when cattle are fed ingredients commonly used in beef feedlot or dairy diets.

Keywords: Diet, Gas production, *Phlomis cancellata Bunge*, Rumen, Silver nanoparticles.